

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN MAMAN
UNGU (*Cleome rutidospermae* D.C.) TERHADAP SEL HeLa DAN SEL WiDr**



**Disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Strata I pada Jurusan Farmasi
Fakultas Farmasi**

Oleh:

SAFIRA MAHARANI

K 100 150 151

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
2019**

HALAMAN PERSETUJUAN

AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN MAMAN UNGU (*Cleome rutidospermae* D.C.) Terhadap Sel HeLa dan Sel WiDr

PUBLIKASI ILMIAH

oleh:

SAFIRA MAHARANI

K 100 150 151

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji oleh:

Dosen Pembimbing



Ratna Yuliani, S.Si, M.Biotech.St.

NIK.957

HALAMAN PENGESAHAN

AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN MAMANGU (*Cleome rutidospermae* D.C.) TERHADAP SEL HeLa DAN SEL WiDr

OLEH

SAFIRA MAHARANI

K 100 150 151

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Pada hari Kamis, 24 Januari 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dewan Penguji:

1. Ika Trisharyanti DK., M.Farm., Apt
(Ketua Dewan Penguji)
2. Wahyu Utami, Ph.D., Apt.
(Anggota I Dewan Penguji)
3. Ratna Yuliani, S.Si, M.Biotech.St.
(Anggota II Dewan Penguji)

(...*[Signature]*...)
(...*[Signature]*...)
(...*[Signature]*...)

Dekan,



[Signature]
Azis Saifudin, Ph.D., Apt

NIK. 956

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam naskah publikasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kelak terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka akan saya pertanggungjawabkan sepenuhnya.

Surakarta, 21 Januari 2019

Penulis



SAFIRA MAHARANI

K 100 150 151

AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN MAMAN UNGU (*Cleome rutidospermae* D.C.) TERHADAP SEL HeLa DAN SEL WiDr

Abstrak

Kanker serviks menduduki urutan kedua dengan jumlah kejadian paling sering pada wanita di Indonesia. Kanker kolorektal adalah kanker paling umum dan penyebab utama kematian terbesar ketiga pada pria dan wanita. Terapi kanker saat ini memiliki nilai efektivitas yang rendah dan dalam beberapa kasus menunjukkan efek toksisitas yang tidak dapat ditolerir, sehingga hal tersebut memicu digunakannya tanaman sebagai alternatif dalam pengobatan antikanker. Maman ungu merupakan salah satu tanaman yang memiliki aktivitas antikanker. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat daun mamam ungu terhadap sel HeLa dan sel WiDr serta mengetahui golongan senyawa yang terkandung didalamnya. Ekstrak daun mamam ungu didapatkan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat. Uji aktivitas sitotoksik menggunakan metode MTT assay. Golongan senyawa diidentifikasi dengan menggunakan metode tabung. Hasil uji aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat daun mamam ungu menunjukkan aktivitas tidak poten terhadap sel HeLa dan sel WiDr dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 236 dan 281,83 $\mu\text{g/mL}$. Hasil analisis skrining fitokimia menunjukkan bahwa golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etil asetat daun mamam ungu antara lain flavonoid dan terpenoid. Ekstrak etil asetat daun mamam ungu memiliki aktivitas sitotoksik tidak poten sehingga tidak dapat digunakan sebagai agen anti kanker baru.

Kata Kunci: *Cleome rutidospermae*, MTT assay, HeLa, WiDr.

Abstract

Cervical cancer is the second leading cancer with the most frequent occurrence in women in Indonesia. Colorectal cancer is the most common cancer and the third leading cause of death in men and women. Cancer therapy currently has low effectiveness value and in some cases shows an intolerable toxicity effect. Hence, it is necessary to use plants as an alternative to anticancer treatment. Fringed spider flower (*Cleome rutidospermae* D.C.) is one of the plants that has anticancer activity. The purpose of this research was to investigate the cytotoxic activity of ethyl acetate extract of leaves of fringed spider flower against HeLa cells and WiDr cells and investigate the class of compounds in the extract. Leaf extract was obtained by maceration method using ethyl acetate as solvents. The cytotoxic assay was performed based on MTT assay method. The compounds were identified with the tube method. The results of cytotoxic activity test showed that the extract did not have cytotoxic activity against HeLa cells and WiDr cells with IC_{50} values of 236 and 281,83 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results of the phytochemical screening analysis showed that the extract contains flavonoids and terpenoids. Ethyl acetate extract of leaves of fringed spider flower did not have potential cytotoxic activity to be used as a new anticancer agent.

Keywords: *Cleome rutidospermae*, MTT assay, HeLa, WiDr.

1. PENDAHULUAN

Kanker adalah sekelompok penyakit yang ditandai oleh pertumbuhan yang tidak terkendali dan penyebaran sel-sel secara abnormal (*American Cancer Society*, 2017). Pada tahun 2020 diperkirakan akan terjadi kasus baru terkait kanker dan jumlahnya mencapai 15 juta kasus setiap tahunnya, 70% di antaranya akan terjadi pada negara berkembang (*Vorobiof et al.*, 2007). Menurut data Badan Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), kanker menjadi salah satu penyebab utama kematian terbesar kedua di dunia dengan jumlah kematian sebanyak 8,8 juta pada tahun 2015. Kanker payudara, kolorektal, paru-paru, leher rahim, dan perut adalah kanker yang paling sering terjadi pada wanita.

Pada tahun 2012 terdapat 528.000 kasus baru dan sebesar 266.000 kasus kematian akibat kanker serviks. Angka insiden kanker serviks di dunia sebesar 17,1% per 100.000 penduduk, sedangkan di Indonesia setiap tahunnya diperkirakan sebanyak 32.469 wanita didiagnosis dengan kanker serviks dan sebanyak 18.279 mengalami kematian akibat kanker serviks (*Information Centre on HPV and Cancer*, 2018). Kanker kolorektal adalah kanker paling umum dan penyebab utama kematian terbesar ketiga pada pria dan wanita. Angka kejadian kanker kolorektal telah menurun selama beberapa dekade karena terjadi perubahan pola dalam faktor risiko. Pada tahun 2014 sebanyak 71.830 pria dan 65.000 wanita didiagnosis dengan kanker kolorektal dan 26.270 pria dan 24.040 wanita meninggal karena penyakit ini. Lebih dari sepertiga dari semua kematian (29% pada pria dan 43% pada wanita) terjadi pada individu yang berusia 80 tahun (*Siegel et al.*, 2014). Penggunaan obat herbal sebagai pengobatan alternatif pada pasien kanker telah diterapkan pada pasien kanker leher rahim dan kanker payudara (*Radji et al.*, 2010). Jenis obat herbal yang digunakan antara lain mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheef. Boerl.), temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.), dan buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) (*Radji et al.*, 2010). Pengobatan alternatif didefinisikan sebagai pengganti dari pengobatan konvensional (*Radji et al.*, 2010).

Pengobatan kanker saat ini memiliki nilai keefektifan yang rendah dan dalam beberapa kasus menunjukkan efek toksisitas yang tidak dapat ditolerir. Sehingga karena keamanan farmakologisnya, pengobatan herbal dengan tanaman obat digunakan tidak hanya untuk mencegah kanker tetapi juga untuk mengobati kanker tersebut (*Tavakoli et al.*, 2012). Tanaman obat adalah tanaman yang pada bagian akar, batang, kulit, dan daun dipercaya mampu menyembuhkan penyakit (*Iman et al.*, 2017). Salah satu tanaman tersebut berasal dari famili *Capparaceae* diketahui memiliki aktivitas secara luas antara lain sebagai antikanker, antibakteri, analgesik, antiinflamasi, diuretik. Maman ungu (*Cleome rutidospermae*) merupakan salah satu tanaman yang berasal dari famili *Capparaceae*. Tanaman mahan ungu dimanfaatkan sebagai analgesik, antiparasit, antimikroba, diuretik, dan laksatif (*Bose et al.*, 2010). Ekstrak etil asetat *Cleome gynandra* memiliki nilai IC_{50} sebesar 90,2 μ g/mL

dalam uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 (Saravanan *et al.*, 2017). Ekstrak etil asetat *Cleome viscosa* memiliki nilai IC₅₀ 326,67 µg/mL terhadap sel HeLa (Jayaprakash *et al.*, 2016). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat daun mamon ungu terhadap sel HeLa dan sel WiDr dan mengetahui golongan senyawa yang terkandung didalamnya.

2. METODE

2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu peralatan gelas (Pyrex), labu alas bulat (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), timbangan analitik (Ohaus), bejana maserasi, *waterbath* (Memmert), *haemocytometer*, inkubator CO₂ (Binder), vorteks (Thermolyne Corporation, tipe Maxi Mix II 37600), mikropipet (Socorex), lampu UV 254 nm dan UV 366 nm, *Cytotoxic Safety Cabinet* (ESCO, tipe cytoculture), *vacuum compressor* (Vacuubrand), corong Buchner, sonikator, ELISA reader (Biotek ELX 800), mikroskop (Olympus, tipe CKX41), Opti Lab, *rotary evaporator* (Heidolph), dan almari pengering.

2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun mamon ungu yang diperoleh dari daerah Bekasi, Jawa Barat, sel kanker HeLa dan sel kanker WiDr yang diperoleh dari Laboratorium bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, pelarut *dimethyl sulfoxide* (DMSO) 1%, aluminium foil, *96-well plate*, *micro centrifuge tube*, *conical tube*, *blue tip*, *yellow tip*, reagen Dragendorff, FeCl₃ 1%, asam sulfat pekat, reagen Liebermann-Burchard, reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid (MTT), sel HeLa, sel WiDr, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), reagen *stopper Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10% dalam 0,01 N HCl, NaOH, akuades, penisilin-streptomisin, media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), tripsin-EDTA, dan doksorubisin.

2.3 Ekstraksi Daun Mamon Ungu

Daun mamon ungu dicuci hingga bersih, dikeringkan di dalam almari pengering, kemudian dihaluskan dengan blender. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Simplisia yang telah halus kemudian ditimbang sebanyak 200 gram, dimasukkan simplisia yang sudah ditimbang ke dalam bejana wadah kaca, ditambahkan pelarut etil asetat sebanyak 1400 mL, diaduk dengan batang pengaduk, direndam di dalam bejana wadah kaca, dan ditutup rapat. Simplisia direndam selama 3 hari, sambil sesekali diaduk. Hasil rendaman simplisia disaring dengan menggunakan corong Buchner. Hasil filtrat yang telah disaring diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C. Ekstrak cair yang telah diuapkan, dipekatkan di atas *waterbath* sampai menjadi ekstrak kental.

Sebelum diletakkan di atas *waterbath* ekstrak ditimbang terlebih dahulu sebelum dan sesudah penguapan untuk mengetahui jumlah berat ekstrak yang didapatkan setelah pelarut menguap.

2.4 Skrining Fitokimia

2.4.1 Uji Alkaloid

Uji alkaloid menggunakan pereaksi Mayer dan Dragendorff. Ekstrak sebanyak 40 mg ditambahkan 5 mL ammonia 30% dan digerus dalam mortir kemudian ditambahkan 20 mL kloroform sambil terus digerus. Campuran disaring dengan kertas saring. Terbentuk dua lapisan, lapisan A berupa filtrat larutan organik, sebagian larutan A diambil 10 mL dan diekstraksi dengan 10 mL larutan HCl 1:10 dengan bantuan pengocokan tabung reaksi kemudian diteteskan beberapa tetes pada kertas saring dan disemprot dengan pereaksi Dragendorff sehingga akan terbentuk warna merah atau jingga pada kertas saring. Bagian atas larutan A hasil pengocokan diambil dan digunakan sebagai Larutan B kemudian larutan B dibagi dalam dua tabung reaksi. Tabung I ditambahkan pereaksi Dragendorff dan tabung II ditambahkan pereaksi Mayer. Adanya endapan berwarna merah bata setelah penambahan pereaksi Dragendorff dan endapan putih setelah ditambahkan pereaksi Mayer menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Djamil and Anelia, 2009).

2.4.2 Uji Flavonoid

Ekstrak sebanyak 40 mg ditambahkan 100 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit kemudian disaring dengan kertas saring hingga didapat filtrat sebagai larutan percobaan. Filtrat sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan serbuk Mg, 1 mL HCl pekat, dan 5 mL amil alkohol. Tabung digojog kuat hingga memisah. Apabila terbentuk warna pada lapisan amil alkohol menandakan adanya senyawa flavonoid (Djamil and Anelia, 2009).

2.4.3 Uji Terpenoid

Ekstrak sebanyak 20 mg dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam di dalam wadah tertutup rapat kemudian disaring. Filtrat diuapkan di atas cawan penguap hingga diperoleh residu kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Buchard. Terbentuknya warna hijau atau merah menunjukkan adanya senyawa golongan steroid atau triterpenoid (Djamil and Anelia, 2009).

2.4.4 Uji Saponin

Larutan percobaan sebanyak 10 mL yang diperoleh dari uji flavonoid dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan digojog selama 10 detik secara vertikal, kemudian didiamkan selama 10 menit. Terbentuknya busa yang stabil dalam tabung reaksi dengan penambahan 1 tetes HCl 1% menunjukkan adanya senyawa golongan saponin (Djamil and Anelia, 2009).

2.4.5 Uji Tanin

Ekstrak sebanyak 40 mg ditambahkan 100 mL air kemudian dididihkan selama 15 menit. Campuran didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring kemudian ditambahkan larutan besi (III) klorida. Terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa golongan tanin (Djamil and Anelia, 2009).

2.4.6 Uji Polifenol

Ekstrak sebanyak 50 mg dilarutkan ke dalam 5 mL air kemudian ditambahkan 2-3 tetes FeCl_3 . Terbentuknya warna hijau tua menunjukkan adanya senyawa fenol (Djamil and Anelia, 2009).

2.5 Uji MTT

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT *assay* dengan kepadatan sel 1×10^4 sel/sumuran. Kultur sel dilakukan dengan diambil panen sel sebanyak 300 μL dan dimasukkan ke dalam *conical* steril baru kemudian ditambahkan media kultur RPMI sebanyak 5 mL dan diresuspensi. Sel dituang ke dalam dish baru dan diinkubasi pada inkubator CO_2 dengan suhu 37°C selama semalam. Panen sel dilakukan saat sel sudah 80% konfluen kemudian media dibuang dengan pipet pasteur steril. Sel dicuci dengan menggunakan PBS kemudian ditambahkan tripsin-EDTA dan diinkubasi didalam inkubator CO_2 selama 5 menit. Setelah diinkubasi ditambahkan media, diresuspensi, dan sel ditransfer ke dalam *conical* steril. Sel yang diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C , dikeluarkan dari inkubator CO_2 kemudian media dibuang. Setelah sel konfluen, ditambahkan kontrol positif doksorubisin konsentrasi (1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25 $\mu\text{g/mL}$) untuk sel WiDr dan sel HeLa, kontrol pelarut DMSO, serta ekstrak etil asetat daun mamon ungu dengan konsentrasi (31,25; 62,5; 125; 250; 500 $\mu\text{g/mL}$) ke dalam sumuran. Sel diinkubasi di dalam inkubator CO_2 pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Reagen MTT (0,5 mg/mL) disiapkan dengan mengencerkan stok MTT sebanyak 1 mL dengan media kultur RPMI hingga 10 mL. Sel hasil inkubasi kemudian dicuci dengan PBS dan ditambah 100 μL MTT ke setiap sumuran, termasuk kontrol media. Sel diinkubasi di inkubator CO_2 selama 2-4 jam dengan suhu 37°C , kemudian diperiksa dengan mikroskop. Jika kristal formazan sudah terbentuk jelas, ditambahkan reagen *stopper* (SDS 10% dalam 0,01 N HCl). Kemudian *plate* dibungkus dengan kertas aluminium dan diinkubasi pada suhu kamar di tempat gelap selama satu malam. Pembacaan absorbansi masing-masing sumuran dilakukan menggunakan ELISA *reader* dengan $\lambda = 550 \text{ nm}$ (Cancer Chemoprevention Research Center, 2014).

2.6 Teknik Analisis Data

2.7.1 Skrining Fitokimia

Uji skrining fitokimia yang dilakukan merupakan uji kualitatif yang digunakan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung pada ekstrak etil asetat daun mamon ungu. Analisis golongan senyawa didasarkan pada terbentuknya endapan, warna, atau buih setelah perlakuan dengan pereaksi.

Tabel 1. Cara analisis skrining fitokimia uji kualitatif ekstrak etil asetat daun mamon ungu dengan metode tabung

Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil
Alkaloid	Mayer	Terbentuk endapan putih
	Dragendorff	Terbentuk endapan merah bata
Flavonoid	Mg + HCl pekat	Terbentuk warna kuning hingga merah pada lapisan amil alkohol
Saponin	Air + HCl	Terbentuk buih stabil
Terpenoid	Liebermann Burchard	Terbentuknya warna hijau atau merah
Tanin	FeCl ₃	Terbentuk endapan biru tua atau hijau kehitaman
Polifenol	FeCl ₃	Terbentuk warna hijau tua

2.7.2 Hasil Uji Sitotoksik

Hasil uji sitotoksik diperoleh dengan menghitung persentase sel hidup berdasarkan data absorbansi sel. Data dibuat kurva hubungan antara log konsentrasi vs rerata persen sel hidup dan dihitung nilai IC₅₀. Pada perhitungan IC₅₀ diperoleh absorbansi 3 macam kontrol dan senyawa uji yang meliputi:

- 1). Kontrol sel : berisi media kultur + sel
- 2). Kontrol pelarut : berisi media kultur + sel + DMSO
- 3). Kontrol media : berisi media kultur
- 4). Perlakuan : berisi media kultur +sel +senyawa uji

Jika absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dengan kontrol sel:

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\% \quad (1)$$

Pada persamaan hasil kurva hubungan antara log konsentrasi vs rerata persen sel hidup dimasukkan nilai $y = 50 \%$ dan dicari x nya kemudian dihitung antilog dari konsentrasi tersebut sehingga diperoleh IC_{50} (Cancer Chemoprevention Research Center, 2014).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstraksi

Teknik ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi yaitu dengan merendam sejumlah simplisia kering ke dalam pelarut etil asetat. Metode maserasi memiliki keuntungan yaitu proses dan peralatan yang digunakan sederhana dan tidak melalui pemanasan sehingga bahan alam yang terkandung dalam tanaman tidak mudah terurai (Nurhasnawati *et al.*, 2017). Ekstrak kental yang didapatkan sebesar 6,67 gram dengan nilai rendemen 3,38%. Ekstrak etil asetat daun mamon ungu mengandung tanin, saponin, alkaloid, dan flavonoid (Patil *et al.*, 2011). Etil asetat digunakan sebagai pelarut untuk mengekstraksi daun mamon ungu. Etil asetat baik digunakan sebagai pelarut untuk maserasi dikarenakan mudah menguap, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas yang rendah (Wardhani and Sulistyani, 2012). Etil asetat merupakan pelarut yang bersifat semi polar dengan toksisitas yang rendah dan mampu menarik senyawa yang bersifat semi polar hingga non polar (Firdiyani *et al.*, 2015).

3.2 Analisis Kandungan Senyawa dengan Metode Tabung

Skrining fitokimia adalah salah satu metode pendekatan yang dapat digunakan untuk mengetahui keberadaan senyawa metabolit sekunder dari suatu tumbuhan (Nohong, 2009). Ekstrak yang diperoleh kemudian diuji kandungan senyawa melalui uji skrining fitokimia dengan metode tabung.

Hasil skrining fitokimia pada (Tabel 2) menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid dan terpenoid. Ekstrak etil asetat daun mamon ungu mengandung tanin, saponin, alkaloid, dan flavonoid (Patil *et al.*, 2011). Hasil yang didapatkan memiliki perbedaan kandungan metabolit sekunder dengan penelitian sebelumnya yaitu terletak pada keberadaan kandungan alkaloid, tanin, dan saponin. Hal tersebut dikarenakan pengambilan tanaman berasal dari tempat yang berbeda. Tanaman yang digunakan pada penelitian Patil *et al* (2011) diperoleh dari kebun raya pada Universitas Bhavan, Andheri, Mumbai, sedangkan pada penelitian ini tanaman mamon ungu diperoleh dari daerah Bekasi, Jawa Barat, yang tumbuh pada tanah dan bebatuan. Perbedaan tekstur tanah dan kandungan hara seperti nitrogen (N), kalium (K), dan bahan organik (BO) mempunyai hubungan yang berbanding lurus terhadap metabolit sekunder (Salim *et al.*, 2016).

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia uji kualitatif ekstrak etil asetat daun mamon ungu dengan metode tabung

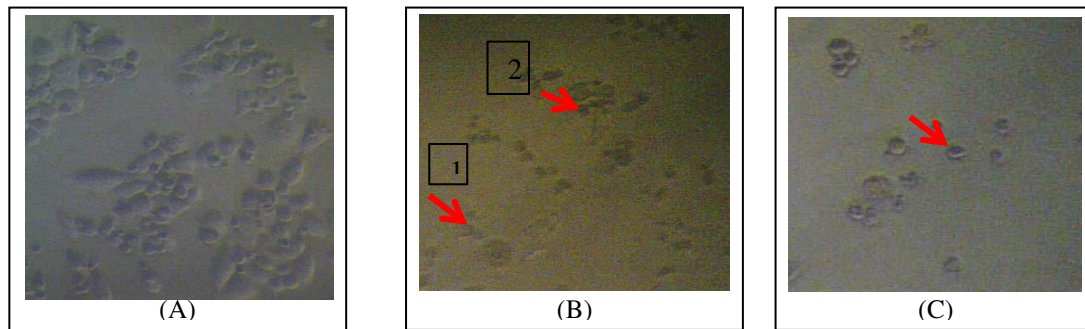
Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Alkaloid	Mayer	Tidak terbentuk endapan putih	Negatif
	Dragendorff	Terbentuk endapan putih	Negatif
Flavonoid	Mg + HCl pekat	Terbentuk warna hijau muda pada lapisan amil alkohol	Positif
Saponin	Air + HCl	Tidak terbentuk busa stabil	Negatif
Terpenoid	Liebermann Burchard	Terbentuknya warna hijau	Positif
Tanin	FeCl ₃	Tidak terjadi endapan biru tua atau hijau kehitaman	Negatif
Polifenol	FeCl ₃	Terbentuk warna putih kekuningan	Negatif

3.3 Uji Sitotoksik dengan Metode MTT-assay

Uji aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat daun mamon ungu dilakukan dengan menggunakan metode MTT-assay. Prinsip metode ini adalah terjadinya pembentukan kristal formazan tidak larut yang berwarna ungu yang didasarkan pada reaksi reduksi reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) yang dikatalisis enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat di sel hidup (Arifianti *et al.*, 2014). Pemberian *reagen stopper* dapat melarutkan kristal berwarna ini dan kemudian diukur absorbansinya dengan *ELISA reader*. Semakin tinggi intensitas warna ungu, maka menandakan semakin banyak jumlah sel yang (*Cancer Chemoprevention Research Center*, 2014).

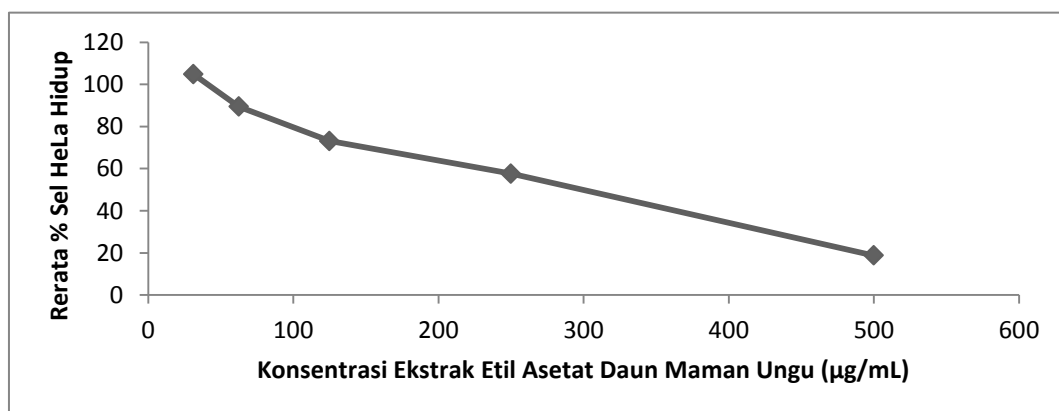
Pada penelitian ini uji aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat daun mamon ungu dilakukan terhadap sel HeLa dan sel WiDr. Secara morfologi, sel HeLa merupakan sel epitelial yang sudah dimasuki *Human Papiloma Virus* (HPV) tipe 18. Sel diamati dengan mikroskop untuk membedakan morfologi pada kontrol sel dengan sel yang sudah mati akibat perlakuan ekstrak dan kontrol positif. Sel HeLa yang hidup sebelum diberi perlakuan berbentuk poligonal atau bulat dan menggerombol dengan inti berwarna terang, sedangkan sel yang sudah mati akibat diberi perlakuan ekstrak etil

asetat daun mamon ungu konsentrasi 500 µg/mL berbentuk tidak beraturan, tidak menggerombol, dengan inti berwarna hitam (Gambar 1).



Gambar 1. Morfologi sel HeLa. Kontrol sel HeLa (A). 1. Sel HeLa hidup; 2. Sel HeLa mati akibat perlakuan ekstrak etil asetat daun mamon ungu konsentrasi 500 µg/mL (B). Sel HeLa mati akibat perlakuan kontrol positif doksorubisin konsentrasi 50 µg/mL (C).

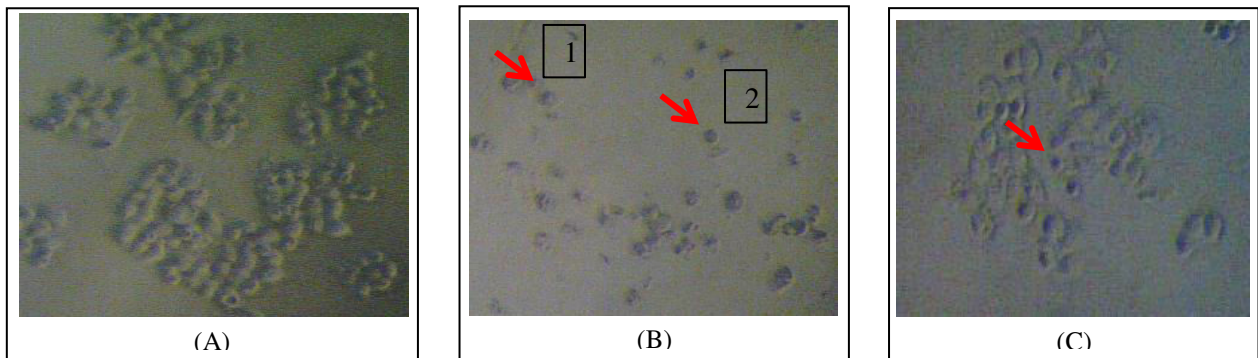
Menurut *National Cancer Institute*, ekstrak disebut memiliki aktivitas sitotoksik poten terhadap sel kanker apabila nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ (Sriwiryajan *et al.*, 2014). Nilai IC_{50} ekstrak etil asetat daun mamon ungu diperoleh dari persamaan regresi linier ($y=bx+a$) dengan nilai $y= -67,665x + 210,62$. Nilai R^2 yang didapat adalah 0,9515. Ekstrak etil asetat daun mamon ungu memiliki nilai IC_{50} sebesar 236 µg/mL terhadap sel HeLa. Sehingga ekstrak etil asetat daun mamon ungu dinilai memiliki aktivitas yang tidak poten terhadap sel HeLa. Gambar 2 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin rendah jumlah rerata % sel hidup. Hal tersebut menunjukkan bahwa persentase hambatan ekstrak etil asetat sel HeLa memiliki sifat *dose dependent*, dengan arti semakin tinggi konsentrasi yang diberikan semakin banyak sel HeLa yang mati.



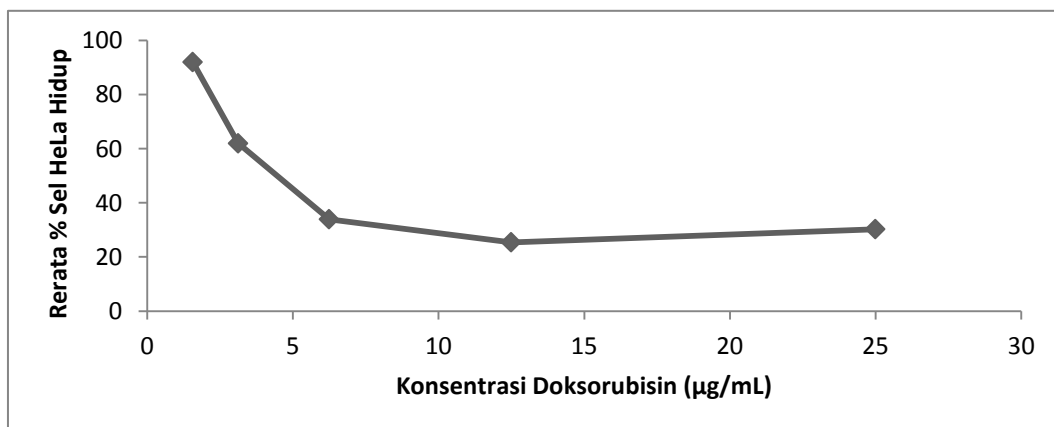
Gambar 2. Pengaruh perlakuan ekstrak etil asetat daun mamon ungu terhadap rerata % sel HeLa hidup

Pada penelitian ini digunakan kontrol positif yaitu doksorubisin yang digunakan untuk membandingkan aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat daun mamon ungu dengan doksorubisin serta

untuk memastikan bahwa sel mengalami kematian akibat perlakuan ekstrak ataupun sensitif terhadap pemberian kontrol positif bukan dikarenakan kesalahan prosedur uji sitotoksik. Nilai IC_{50} dokсорubisin diperoleh dari persamaan regresi linier ($y=bx+a$) dengan nilai $y= -53,192x + 91,037$. Nilai R^2 yang didapat adalah 0,813. Dokсорubisin memiliki nilai IC_{50} sebesar 6 $\mu\text{g/mL}$ terhadap sel HeLa. Sel HeLa menunjukkan reaksi yang sensitif terhadap pemberian dokсорubisin ditunjukkan dengan $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$. Gambar 3 tidak menunjukkan linieritas yang baik dikarenakan pada konsentrasi dokсорubisin tertinggi 25 ($\mu\text{g/mL}$) terjadi peningkatan rerata % sel HeLa hidup. Konsentrasi dokсорubisin 25 ($\mu\text{g/mL}$) memiliki hasil rerata % sel hidup 30,222% yang lebih besar daripada rerata % sel hidup pada konsentrasi 12,5 ($\mu\text{g/mL}$) sebesar 25,407%. Seharusnya semakin rendah konsentrasi dokсорubisin yang diberikan semakin banyak pula jumlah % sel hidup begitu juga sebaliknya. Pada penelitian ini tidak dapat dijelaskan penyebab peningkatan rerata % sel hidup dikarenakan prosedur uji sitotoksik sudah dilakukan dengan benar.



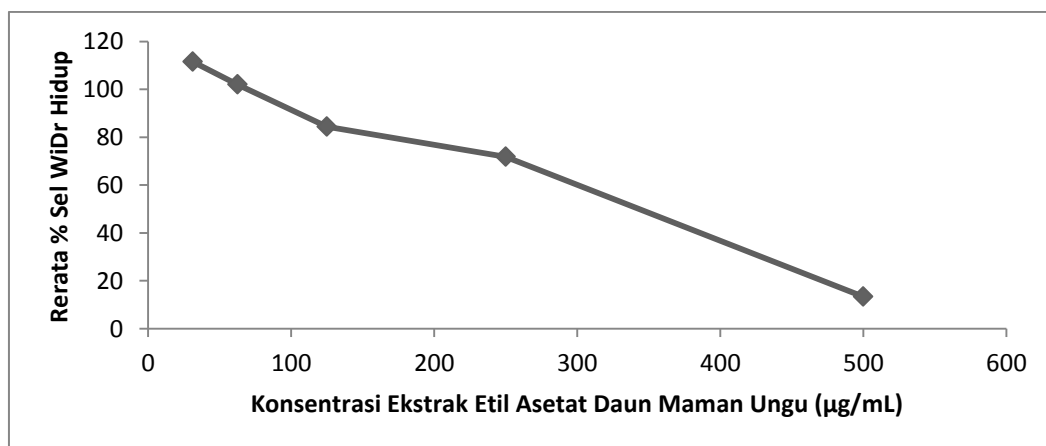
Gambar 3. Morfologi sel WiDr. Kontrol sel WiDr (A). 1. Sel WiDr hidup; 2. Sel WiDr mati akibat perlakuan ekstrak etil asetat daun mamon konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ (B). Sel WiDr mati akibat perlakuan kontrol positif dokсорubisin konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$ (C).



Gambar 4. Pengaruh perlakuan dokсорubisin terhadap rerata % sel HeLa hidup

Penelitian ini juga menggunakan sel kanker kolon yaitu sel WiDr. Sel diamati dengan mikroskop untuk membedakan bentuk morfologi pada kontrol sel dengan sel yang sudah mati akibat perlakuan ekstrak dan kontrol positif. Sel WiDr yang hidup sebelum diberi perlakuan berbentuk bulat, menggerombol dan inti berwarna terang, sedangkan sel yang sudah mati akibat diberi perlakuan ekstrak etil asetat daun mamon ungu konsentrasi 500 µg/mL berbentuk bulat, tidak menggerombol atau terpisah dengan sel tetangga lain, dan inti berwarna hitam (Gambar 4).

Nilai IC_{50} ekstrak etil asetat daun mamon ungu diperoleh dari persamaan regresi linier ($y=bx+a$) dengan nilai $y= -74,886x +233,77$. Nilai R^2 yang didapat adalah 0,8598. Ekstrak etil asetat daun mamon ungu memiliki nilai IC_{50} sebesar 281,83 µg/mL terhadap sel kanker WiDr sehingga ekstrak etil asetat daun mamon ungu dinilai memiliki aktivitas yang tidak poten terhadap sel WiDr. Gambar 5 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin rendah jumlah rerata % sel hidup. Ekstrak etil asetat daun mamon ungu memiliki sifat *dose dependent* terhadap persentase hambatan sel WiDr, dengan arti semakin tinggi konsentrasi yang diberikan semakin banyak sel WiDr yang mati.



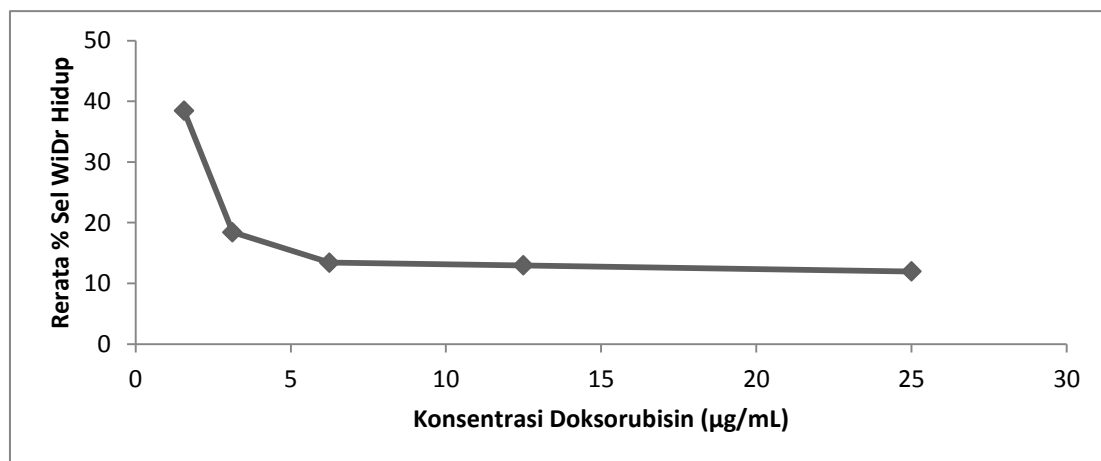
Gambar 5. Pengaruh perlakuan ekstrak etil asetat daun mamon ungu terhadap rerata % sel WiDr hidup

Sel kanker WiDr yang diberikan perlakuan doksorubisin menunjukkan konsentrasi doksorubisin berbanding lurus dengan rerata % sel hidup. Semakin tinggi konsentrasi doksorubisin yang diberikan semakin kecil rerata % sel hidup. Doksorubisin menunjukkan sifat *dose dependent* terhadap persentase hambatan sel WiDr. Nilai IC_{50} doksorubisin terhadap sel WiDr tidak dapat dihitung dikarenakan rerata % sel hidup dari kelima konsentrasi doksorubisin dibawah 50% dan tidak ada yang melebihi dari 50% (Tabel 2). Nilai IC_{50} dapat dihitung apabila konsentrasi doksorubisin diturunkan dengan harapan adanya jumlah sel hidup lebih dari 50% sehingga dapat diperkirakan nilai IC_{50} doksorubisin terhadap sel WiDr yaitu <1,5625 µg/mL sehingga dapat

disimpulkan bahwa doksorubisin memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etil asetat daun mamon ungu.

Tabel 2. Hubungan antara konsentrasi doksorubisin dengan rerata % sel WiDr hidup

Konsentrasi Doksorubisin ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata % Sel Hidup
1,562	38,436
3,125	18,436
6,25	13,408
12,5	12,961
25	11,955



Gambar 6. Pengaruh perlakuan doksorubisin terhadap rerata % sel WiDr hidup

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun mamon ungu memiliki aktivitas sitotoksik yang tidak poten terhadap sel HeLa dan sel WiDr dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 236 dan 281,83 $\mu\text{g/mL}$. Tanaman yang memiliki kesamaan genus dengan mamon ungu salah satunya adalah *Cleome viscosa*. Ekstrak etil asetat *Cleome viscosa* diketahui memiliki nilai IC_{50} sebesar 326,67 $\mu\text{g/mL}$ terhadap sel HeLa (Jayaprakash *et al.*, 2016). Mamon ungu memiliki kesamaan genus dengan *Cleome viscosa* tetapi memiliki aktivitas sitotoksik yang berbeda terhadap sel HeLa. Nilai IC_{50} ekstrak etil asetat daun mamon ungu lebih kecil daripada ekstrak etil asetat *Cleome viscosa* dengan arti aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat daun mamon ungu lebih tinggi daripada ekstrak etil asetat *Cleome viscosa*.

4. PENUTUP

Ekstrak etil asetat daun mamon ungu memiliki aktivitas sitotoksik yang tidak poten terhadap sel HeLa dan sel WiDr. Ekstrak etil asetat daun mamon ungu memiliki kandungan senyawa flavonoid dan terpenoid.

DAFTAR PUSTAKA

- American Cancer Society, 2017, *Cancer Facts and Figures*, American Cancer Society, America.
- Arifianti L., Sukardiman, Studiawan H., Rakhmawati and Megawati L., 2014, Uji Aktivitas Ekstrak Biji Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Sel Kanker Mamalia Secara In vitro, *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 1 (2), 63–66.
- Bose A., Smith P.J., Lategan C.A., Gupta J.K. and Sudam Si., 2010, Studies on in vitro antiplasmodial activity of *Cleome rutidospermae*, *Acta Poloniae Pharmaceutical Drug Research*, 67 (3), 315–318.
- Cancer Chemoprevention Research Centre, 2014, *Protokol Uji Sitotoksik MTT*. Terdapat di: http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=240 [Diakses pada: 20 Maret 2018].
- Djamil R. and Anelia T., 2009, Penapisan Fitokimia , Uji BSLT , dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol beberapa Spesies Papilionaceae, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7 (2), 65–71.
- Firdiyani F., Agustini T.W. and Ma'ruf W.F., 2015, Ekstraksi Senyawa Bioaktif Sebagai Antioksidan Alami *Spirulina platensis* Segar dengan Pelarut Yang Berbeda, *JPHPI*, 18 (1), 28–37.
- Information Centre on HPV and Cancer, 2018, *Human Papillomavirus and Related Diseases Report from Indonesia*, Dalam *Human Papillomavirus and Related Diseases Report*, Information Centre on HPV and Cancer, pp. 1–73. Terdapat di: www.hpvcentre.net.
- Iman S. and Jumani, 2017, Riap Tanaman Ulin (*Eusideroxylon zwageri* Teijsm & Binn) di Khdtk Samboja kecamatan Samboja Kabupaten Kutai Kertanegara Provinsi Kalimantan Timur, *Jurnal AGRIFOR*, 16 (1), 49–58.
- Jayaprakash A.P., Krishnakumar. R.K., Srinivasan K.K., Jyoti H. and Mohammed S.P., 2016, Evaluation of Antioxidant, Cytotoxic and Anticancer Effects of *Cleome viscosa* Linn, *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3 (4), 253–262.
- Nohong, 2009, Skrining Fitokimia Tumbuhan Ophiopogon Jaburan Lodd dari Kabupaten Kolaka Provinsi Sulawesi Tenggara, *Jurnal Pembelajaran Sains*, 5 (2), 172–178.
- Nurhasnawati H., Handayani F. and Samarinda A.F., 2017, Sokletasi Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Bol (*Syzygium malaccense* L.), *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 3 (1), 91–95.
- Patil R.C., Wavhal S.D., Yadav S.S. and Deshpande V.D., 2011, Antibacterial and Bioenhancing Activity of Ethyl Acetate Extract of *Cleome rutidosperma* Leaves, *Journal of Pharmacy Research*, 5 (1), 557–559.
- Radji M., Aldrat H. and Harahap Y., 2010, Penggunaan Obat Herbal pada Pasien Kanker Serviks, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 9 (1), 33–39.
- Salim M., Sitorus H. and Ni T., 2016, Hubungan Kandungan Hara Tanah dengan Produksi Senyawa Metabolit Sekunder pada Tanaman Duku (*Lansium domesticum* Corr var Duku) dan Potensinya sebagai Larvasida, *Jurnal Vektor Penyakit*, 10 (1), 11–18.
- Saravanan R., Pemaiah B., Narayanan M. and Ramalingam S., 2017, Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis, In Vitro Cytotoxic and Antioxidant Efficacy Studies on *Cleome gynandra* L. (Leaves): A Traditional Drug Source, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10 (10), 84–89.
- Siegel R., Desantis C. and Jemal A., 2014, Colorectal Cancer Statistics , 2014, *A Cancer Journal of Clinicians*, 64 (2), 104–117.

- Sriwiryajan S., Ninpesh T., Nasomyon T. and Graidist P., 2014, Cytotoxicity Screening of Plants of Genus Piper in Breast Cancer Cell Lines, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (6), 921–928.
- Tavakoli J., Miar S., Zadehzare M.M. and Akbari H., 2012, Evaluation of Effectiveness of Herbal Medication in Cancer Care : A Review Study, *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 5 (3), 144–156.
- Vorobiof, Abratt D. and P R., 2007, The cancer burden in Africa EDITORIAL The cancer burden in Africa, *South African Medicine Journal*, 97 (10), 937–939.
- Wardhani L.K. and Sulistyani N., 2012, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera Scandens* (L.) Moq.) Terhadap *Shigella Flexneri* Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis, *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 2 (1), 1–16.
- World Health Organization, 2018, *Cancer*, Terdapat di: <http://www.who.int/cancer/en/> [Diakses pada 18 Maret 2018].